

New oligosaccharides obtained by forming anhydro-sugar residue in heparin depolymerization product, are nitrogen monoxide formation inhibitors useful e.g. for treating ischemia, osteoarthritis or neuropathic pain

Publication number: FR2800074

Publication date: 2001-04-27

Inventor: MOURIER PIERRE; PERRIN ELISABETH;
STUTZMANN JEAN MARIE; VISKOV CHRISTIAN;
WAHL FLORENCE

Applicant: AVENTIS PHARMA SA (FR)

Classification:






- international: C07H11/00; A61K31/7024; A61P9/10; A61P19/00;
A61P19/02; A61P25/00; A61P25/14; A61P25/16;
A61P25/28; C07H19/01; C08B37/00; C08B37/10;
C07H11/00; A61K31/7024; A61P9/00; A61P19/00;
A61P25/00; C07H19/00; C08B37/00; (IPC1-7):
C07H3/06; A61K31/702; A61P19/00; A61P25/00;
C08B37/00

- European: C07H19/01; C08B37/00P2

Application number: FR19990013182 19991022

Priority number(s): FR19990013182 19991022

Also published as:

 WO0129055 (A3)
 WO0129055 (A2)
 EP1226148 (A3)
 EP1226148 (A2)
 MXPA02003945 (A)

more >>

Report a data error here

Abstract of FR2800074

Oligosaccharides (I), containing a terminal 1,6-anhydro-2-deoxy-2-amino- beta -D-mannopyranose unit, are new. Oligosaccharides of formula (I) and their mixtures and diastereomers, containing a terminal 1,6-anhydro-2-deoxy-2-amino- beta -D-mannopyranose unit, are new. n = 0-25; R1, R3-R5 = H or SO3M; R2, R6 = H, SO3M or COMe, and M = Na, Ca, Mg or K. An Independent claim is included for the preparation of (I).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 800 074**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **99 13182**

⑤1 Int Cl⁷ : C 07 H 3/06, C 08 B 37/00, A 61 K 31/702, A 61 P 19/00, 25/00

①2 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 22.10.99.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 27.04.01 Bulletin 01/17.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : AVENTIS PHARMA S.A. Société ano-
nyme — FR.

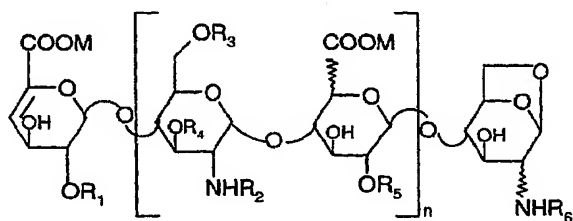
⑦2 Inventeur(s) : MOURIER PIERRE, PERRIN
ELISABETH, STUTZMANN JEAN MARIE, VISKOV
CHRISTIAN et WAHL FLORENCE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) :

⑤4 **NOUVEAUX OLIGOSACCHARIDES, LEUR PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES
LES CONTENANT.**

⑤7 La présente invention concerne des oligosaccharides
de formule:



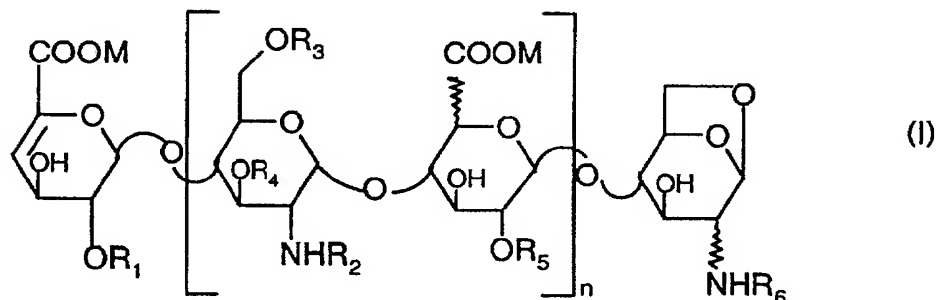
leurs mélanges, leurs diastéréoisomères, leur procédé
de préparation et les compositions pharmaceutiques les
contenant.

FR 2 800 074 - A1



NOUVEAUX OLIGOSACCHARIDES, LEUR PREPARATION ET LES
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT

La présente invention concerne des oligosaccharides de formule :



- 5 leurs mélanges, leurs diastéréoisomères, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

Des disaccharides sulfatés possédant en extrémité réductrice une structure 1,6-anhydro ont été décrits par H.P. WESSEL, J. Carbohydrate Chemistry, 11(8), 1039-1052 (1992); aucune activité pharmacologique n'est mentionnée pour ceux-ci.

- 10 Des trisaccharides sulfatés comportant un motif 1,6-anhydro ont également été décrits dans le brevet EP84999 et par Y. ICHIKAWA et coll., Carbohydr. Res, 141, 273-282 (1985) comme intermédiaires pour la préparation d'oligosaccharides supérieurs. Ces trisaccharides ont une faible activité anti-Xa.

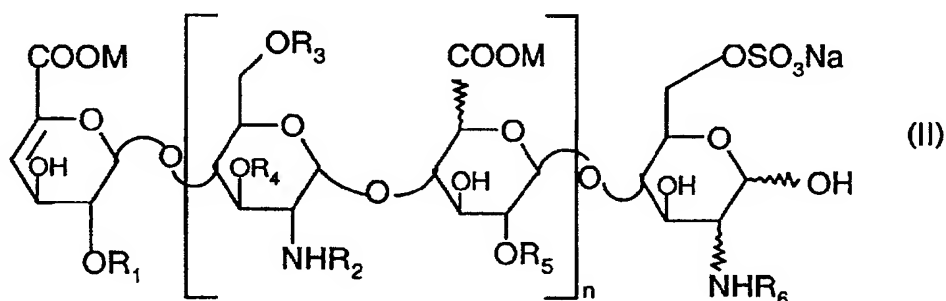
- 15 Dans la formule (I) n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄ et R₅, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₆, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium.

Ces oligosaccharides comportent ainsi un nombre pair de saccharides.

Dans la formule (I), R₄ est, de préférence, un atome d'hydrogène.

De façon préférentielle, n est un entier de 0 à 10 et, en particulier de 0 à 6 et encore plus particulièrement de 1 à 6.

Les oligosaccharides de formule (I) peuvent être préparés par action d'un hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire sur des oligosaccharides de formule :



5

dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 et R_5 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_6 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium, ou un mélange de ceux-ci.

- 10 Cette réaction s'effectue en milieu aqueux, à une température de 40 à 80°C, à un pH de 10 à 13.

Comme hydroxyde de métal alcalin qui peut être utilisé, on peut citer la soude, la potasse, l'hydroxyde de lithium et l'hydroxyde de césium.

- 15 Comme hydroxyde d'ammonium quaternaire qui peut être utilisé, on peut citer l'hydroxyde de tétrabutylammonium.

La quantité d'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire doit être suffisante pour que le pH du milieu réactionnel reste stable durant toute la durée de la réaction. Il est ainsi nécessaire d'ajouter en continu tout au long de la réaction l'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire.

De préférence, l'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire est sous forme de solution aqueuse de 1 à 5%.

De façon préférentielle, la réaction s'effectue à une température de 60 à 70°C.

Avantageusement, le pH réactionnel est de 11 à 12,5.

- 5 La réaction est arrêtée par acidification du milieu réactionnel, par exemple par addition de résine acide telle que la résine Amberlite IR120^R (Fluka).

- Les oligosaccharides intermédiaires de formule (II) et leurs mélanges peuvent être obtenus par séparation par chromatographie sur gel d'un mélange d'oligosaccharides (III) obtenu par dépolymérisation enzymatique de l'héparine ou dépolymérisation
10 basique de l'ester benzylique de l'héparine ou d'un ester benzylique d'héparine d'hémisynthèse.

- Cette chromatographie s'effectue sur des colonnes remplies de gel de type polyacrylamide-agarose tel que celui commercialisé sous la marque Ultrogel ACA202^R (Biosepra). De préférence, on utilise une batterie de colonnes de gel
15 polyacrylamide agarose. Le nombre de colonnes utilisées est adapté en fonction du volume, du gel et des oligosaccharides à séparer. Le mélange est élué par une solution contenant un tampon phosphate et du chlorure de sodium. De préférence, la solution tampon phosphate est une solution à 0,02 mol/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7) contenant 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La détection des différentes fractions est
20 réalisée par spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les fractions ainsi obtenues peuvent ensuite être éventuellement purifiées par exemple par chromatographie SAX (strong anion exchange) selon les méthodes connues de l'homme du métier et notamment selon les méthodes décrites par K.G. Rice et R.J Linhardt, Carbohydrate Research 190, 219-233 (1989), A. Larnkjaer, S.H. Hansen et P.B. Ostergaard,
25 Carbohydrate Research, 266, 37-52 (1995) et dans le brevet WO90/01501 (exemple 2). Les fractions sont ensuite lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel telle qu'une colonne de gel Séphadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Lorsque la purification n'est pas réalisée par chromatographie SAX, les lyophilisats peuvent être éventuellement purifiés par précipitation simple ou fractionnée selon les méthodes connues de l'homme du métier et notamment selon la méthode décrite dans le brevet FR2548672. De façon générale, on opère selon le protocole suivant :

- 5 La fraction lyophilisée à purifier est dissoute à 25°C dans environ dix volumes d'eau distillée. Par ajout de méthanol ou d'éthanol, on fait précipiter l'oligosaccharide désiré en contrôlant son enrichissement par chromatographie CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance). L'ajout de méthanol ou d'éthanol est déterminé en fonction de la pureté et du rendement désiré du dit oligosaccharide. De même, cette
- 10 opération peut être réalisée en plusieurs étapes successives à partir de la solution initiale de lyophilisat. Pour cela, on rajoute l'agent insolubilisant (méthanol ou éthanol) par petites portions et on isole après chaque ajout le précipité obtenu. Les précipités ainsi préparés sont analysés par chromatographie CLHP. Selon la pureté et le rendement désiré, on rassemble les fractions adéquates de précipité.
- 15 Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1$ ou 2 , il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation enzymatique.

- Cette dépolymérisation s'effectue au moyen d'héparinase I (EC 4.2.2.7), au sein d'une solution tampon phosphate de pH7, en présence de chlorure de sodium et de BSA (Albumine de Sérum Bovin), à une température comprise entre 10 et 18°C et, de
- 20 préférence 15°C, pendant 8 à 10 jours et, de préférence, 9 jours. La dépolymérisation est arrêtée par exemple par chauffage du milieu réactionnel à 100°C pendant 2 minutes et le mélange est récupéré par lyophilisation. Il est préférable d'utiliser 7UI d'héparinase I pour 25 g d'héparine. La solution tampon phosphate comprend généralement 0,05 mol/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7) en présence de 0,1 mol/l de
 - 25 chlorure de sodium. La concentration en BSA est généralement de 2%.

Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0, 1, 2, 3$ ou 4 , il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation d'un ester benzylique de l'héparine.

L'ester benzylique de l'héparine peut être préparé selon les méthodes décrites dans les brevets US5389618, EP40144, FR2548672. Le taux d'estérification sera de préférence compris entre 50 et 100 %. De façon préférentielle, il sera compris entre 70 et 90%.

- 5 La dépolymérisation s'effectue en milieu aqueux, au moyen d'un hydroxyde de métal alcalin (hydroxyde de lithium, soude, potasse ou hydroxyde de césium par exemple) ou d'un hydroxyde d'ammonium quaternaire (hydroxyde de tétrabutylammonium par exemple), de préférence, à une molarité comprise entre 0,1 et 0,2 mol/l, à une température comprise entre 40 et 80°C, pendant 5 à 120 minutes. Dans un mode
10 préféré, on opère pendant 5 à 15 minutes, à une température comprise entre 60 et 70°C, avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,15 mol/l. La réaction de dépolymérisation est arrêtée par neutralisation par addition d'un acide tel que l'acide acétique. Après addition de 10% en poids par volume d'acétate de sodium, le mélange d'oligosaccharides est précipité par addition de méthanol, de préférence, 2 volumes
15 pour 1 volume de milieu réactionnel et filtré.

- Selon un aspect préféré de l'invention, le mélange d'oligosaccharides obtenu après dépolymérisation chimique, sous forme d'une solution aqueuse, est enrichi par ultrafiltration sur membranes avec un seuil de coupure nominal approprié (type Pellicon en cellulose régénérée commercialisées par Millipore); le type de membrane
20 étant adapté en fonction du type d'oligosaccharides enrichis à récupérer. Pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 0$, on utilisera une membrane de seuil de coupure nominal de 1 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 1$, on utilisera une membrane 1 kDa ou 3 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n = 2$, on utilisera une membrane 3 kDa, pour les oligosaccharides (II) pour lesquels $n =$
25 3 ou 4, on utilisera une membrane 5 kDa. Au cours de cette opération, le perméat est récupéré et le rétentat rejeté. Ainsi, la fraction de produit enrichi peut représenter de 50 à 10% du mélange d'oligosaccharides initial tout en conservant au moins 80% de l'oligosaccharide désiré.

Pour les intermédiaires de formule (II) pour lesquels $n = 0$ à 25, il est préférable de partir d'un mélange (III) obtenu par dépolymérisation d'un ester benzylique de polysaccharide sulfaté d'hémisynthèse. L'ester benzylique de polysaccharide sulfaté d'hémisynthèse est préparé à partir de polysaccharides sulfatés d'hémisynthèse obtenus
5 à partir du polysaccharide K5 et selon les méthodes décrites dans les brevets WO94/29352 et WO96/14425. Les conditions d'estérification, de dépolymérisation et de récupération sont les mêmes que celles décrites précédemment pour l'ester benzylique d'héparine.

Dans tous les procédés précédents, l'héparine initiale peut être d'origine porcine, ovine,
10 caprine ou bovine et peut provenir des mucus, poumons ou peaux des animaux. De préférence, on utilise une héparine de mucus porcin, ovin ou de poumons de boeuf et encore plus préférentiellement de mucus porcin.

Les oligosaccharides de formule (I) présentent des propriétés anti-inflammatoires et peuvent ainsi être utilisées pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un
15 processus inflammatoire impliquant la production de substances cytotoxiques telle que le monoxyde d'azote (NO) dont la forme inductible est libérée notamment par les neutrophiles ou les macrophages lorsque ceux-ci migrent et sont activés au niveau d'un tissu. La migration, l'activation et l'adhésion des neutrophiles se produit au niveau des zones tissulaires ischémisées à la suite d'une occlusion ou d'un spasme d'une artère
20 vascularisant ce tissu. Ces ischémies peuvent se produire soit au niveau cérébral (accident vasculaire cérébral), soit au niveau du myocarde (infarctus du myocarde), soit au niveau des membres inférieurs (ischémies dites périphériques). Les oligosaccharides de formule (I) peuvent ainsi être utilisées pour la prévention et/ou le traitement des maladies neurodégénératives pour lesquelles l'inflammation cérébrale
25 joue un rôle délétère pouvant conduire à la mort parmi lesquelles on peut citer les ischémies cérébrales, les ischémies cardiaques (infarctus du myocarde), les ischémies périphériques, les traumatismes du système nerveux central et notamment les traumatismes crâniens, spinaux et cranio-spinaux, la sclérose en plaques, les douleurs neuropathiques et les neuropathies périphériques, les maladies du motoneurone dont la

sclérose latérale amyotrophique, le neuro-sida, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington et certaines formes d'ostéoarthrites notamment à localisation articulaire.

5 L'activité anti-inflammatoire de ces produits est démontrée in vivo dans le test de production de NOx (nitrite et nitrate) induite par un lipopolysaccharide (LPS) provenant d'E. Coli selon le protocole décrit par M. YAMASHITA et coll., Eur. J. Pharmacol, 338, 2, 151-158 (1997) ou J.E. SHELLITO et coll. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 13, 1, 45-53 (1995).

10 On injecte, à des souris CD1 mâles (Charles River, 25-35g), à T0 par voie intraveineuse bolus 0,5 mg/kg de l'oligosaccharide, à T+15 minutes, par voie sous-cutanée 1 ou 2 mg/kg de l'oligosaccharide. A T+30 minutes, on administre 100 mg/kg de lipopolysaccharide (LPS) provenant d'E. Coli (Sigma L3129, sérotype 0127:B8). A T+3 heures on injecte à nouveau par voie sous-cutanée 1 ou 2 mg/kg de l'oligosaccharide. A T+5 heures 30 minutes, un échantillon de sang est récupéré par
15 ponction à l'oeil et les concentrations en NOx (nitrite et nitrate) dans le plasma sont déterminées avec la méthode colorimétrique de Griess après réduction du nitrate en nitrite par nitrate réductase de la manière suivante : 12 µl de l'échantillon de plasma sont mélangés avec 88 µl d'eau déionisée et incubés dans le noir 1 heure à température ambiante avec 40 µl de tampon phosphate (0,31M, pH 7,5), 20 µl de β-NADPH
20 (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit) (0,86mM), 20 µl de FDA (flavine adénine dinucléotide) (0,11 mM) et 20 µl de nitrate réductase (2U/ml) (Boehringer Mannheim). 10 µl de ZnSO₄ (1M) sont ajoutés pour précipiter les protéines et après mélange, les échantillons sont centrifugés à 20 000g pendant 5 minutes. Finalement, 50 µl du supernageant sont incubés 10 minutes à température
25 ambiante avec 100 µl du réactif de Griess (sulfanilamide à 1 % dans un mélange acide phosphorique/naphtyléthylènediamine 0,1% dans l'eau déionisée (V/V)). Les densités optiques sont lues à 540 nm avec un spectrophotomètre microplaques; chaque point

étant déterminé 2 fois. KNO_3 et NaNO_2 sont utilisés comme standard pour la méthode colorimétrique.

Dans ce test, les oligosaccharides selon l'invention inhibent à plus de 50 % la formation de NO_x .

5 Parmi les oligosaccharides de formule (I) préférés, on peut notamment citer les oligosaccharides pour lesquels :

- n est égal à 0, R_1 et R_6 représentent un radical SO_3Na et M est sodium et le mélange de ses diastéréoisomères

10 - n est égal à 1, R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 , représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium et le mélange de ses diastéréoisomères

- n est égal à 2, R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium et le mélange de ses diastéréoisomères.

15 - n est égal à 2, R_1, R_2, R_3, R_6 , représentent un radical SO_3Na , R_5 représente un atome d'hydrogène ou un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium et le mélange de ses diastéréoisomères (dérivé 1,6 anhydro $\Delta\text{Is-Is-IIs}$).

Les exemples suivants sont représentatifs de la préparation des oligosaccharides de formule (I) et des intermédiaires.

Dans ces exemples les significations des abréviations sont les suivantes :

20 ΔIs : (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-enopyranosyluronic)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium ou bien $\Delta\text{UAp}2\text{S}-(1\rightarrow4)-\alpha$ -D-GlcNp2S6S

Is : (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronic)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de tétrasodium ou bien α -L-IdoAp2S- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

IIs : (acide α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranose, sel de trisodium ou bien α -L-IdoAp- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S6S

IIIs : (acide 2-sulfo- α -L-idopyranosyluronique)-(1 \rightarrow 4)-2-déoxy-2-sulfoamino- α -D-glucopyranose, sel de trisodium ou bien α -L-IdoAp2S- (1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNp2S

5 IdoAp : acide idopyranosyluronique

GlcNp : 2-déoxy-2-aminoglucopyranose

Δ Uap : acide 4-déoxy- α -L-thréo-hex-enopyranosyluronique

S : sulfate

EXEMPLES DE PREPARATION DES MELANGES DE FORMULE (II)

10 EXEMPLE A - préparation des oligosaccharides de formule (II) pour lesquels $n=0, 1$ et 2 par dépolymérisation enzymatique et séparation

Dissoudre 25 g d'héparine dans 250 ml d'une solution tampon phosphate contenant 0,05 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7), 0,2 mol/l de chlorure de sodium et 2 % de BSA (Albumine de Sérum Bovin). On introduit dans le mélange 7 UI d'héparinase I
 15 (EC 4.2.2.2.7) et la solution obtenue est refroidie à 15°C puis maintenue à cette température pendant toute la durée de la réaction de dépolymérisation. L'avancement de la réaction est suivie par des prélèvements échelonnés d'aliqots et analysés par chromatographie sur perméation de gel. Au bout de 9 jours, la réaction enzymatique est arrêtée en chauffant le milieu réactionnel à 100°C pendant deux minutes. Le
 20 mélange refroidi est ensuite lyophilisé. On obtient ainsi un mélange d'oligosaccharides (III).

Le mélange d'oligosaccharides (III) obtenu est ensuite chromatographié selon la méthode suivante : La chromatographie s'effectue sur des colonnes remplies avec du gel polyacrylamide-agarose connu sous la dénomination Ultrogel ACA 202 et le
 25 mélange est élué par une solution contenant un tampon phosphate (0,02 mol/l

NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) pH = 7 et 0,1 mol/l de chlorure de sodium. La détection est réalisée en spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les produits peuvent être éventuellement purifiés par chromatographie SAX (strong anion exchange) ou par précipitation fractionnée selon la méthode décrite dans le brevet FR 2548672. Les
5 fractions de produit récupéré sont lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel sephadex G10^R (Pharmacia Biochemicals).

Par cette méthode, on obtient 3 g de disaccharide Is, 1100 mg d'un mélange d'hexasaccharide contenant typiquement 55 % de dérivé ΔIs-Is-Is, 35 % de ΔIs-Is-IIs et 10 % de ΔIs-Is-IIIs. Ce dernier mélange peut être purifié selon les méthodes
10 connues de l'homme du métier pour en séparer chacun des constituants ou utilisé tel quel pour la transformation en dérivés 1,6 anhydro de formule (I). Il est à noter qu'au cours de cette transformation l'hexasaccharide ΔIs-Is-IIIs ne peut conduire à la formation de composés de formule (I).

EXEMPLE B - préparation des oligosaccharides de formule (II) pour lesquels n=0, 1,
15 2, 3 ou 4 par dépolymérisation de l'ester benzylique d'héparine et séparation

a - Préparation de l'ester benzylique de l'héparine

L'ester benzylique de l'héparine est préparé selon l'exemple 3 du brevet US 5,389,618.

b- Dépolymérisation

Dissoudre 100 g d'ester benzylique de l'héparine dans 1,9 l d'eau déminéralisée. Le
20 mélange est porté à 60°C sous agitation. Après l'obtention d'une solution homogène, on introduit en une seule fois environ 35 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 23 %. Après 10 minutes de réaction, la solution est ensuite refroidie et neutralisée par 80 ml d'une solution d'acide acétique environ 2 N. A cette solution, on ajoute 10 % en poids/volume d'acétate de sodium. Le mélange d'oligosaccharides est précipité par
25 addition d'environ 2 volumes de méthanol. Le précipité est isolé par filtration, lavé au

méthanol à deux reprises puis séché sous pression réduite à 50°C. Après séchage, on obtient 73,8 g d'un mélange d'oligosaccharides (II).

c- Enrichissement en oligosaccharide pour lequel $n = 1$

5 Dissoudre 30 g du mélange d'oligosaccharides obtenu précédemment dans environ 35 volumes d'eau. Cette solution est ultrafiltrée sur membrane 3 kDa (Pellicon). Lorsque 600 ml de perméat on été soutirés, on dilue le rétentat par 500 ml d'eau. L'opération est poursuivie jusqu'à soutirement de 450 ml de perméat supplémentaires. Les deux fractions de perméat sont réunies puis concentrées à sec sous pression réduite. On obtient 6,1 g d'un solide blanc jaunâtre. L'analyse du solide par chromatographie de perméation sur gel indique qu'il contient environ 30 % d'oligosaccharide de formule (II) pour lequel $n=1$.

d - Fractionnement des mélanges d'oligosaccharides ultrafiltrés

15 Le mélange enrichi est fractionné sur des colonnes remplies avec du gel polyacrylamide-agarose connu sous la dénomination Ultrogel ACA 202 (on utilise 4 colonnes en série d'un diamètre de 10 cm et d'une hauteur de 50 cm). 5 g du mélange enrichi par ultrafiltration sont dissous dans 25 ml d'eau puis élués par une solution 0,2 mol/l de chlorure de sodium à la vitesse de 5 ml/min. On recueille en bas de colonne des fractions de 25 ml. La détection des produits est réalisée en spectrométrie UV (254 nm) et ionique (IBF). Les fractions de produit pour lequel $n = 1$ sont récupérées, 20 lyophilisées puis désalées sur une colonne remplie de gel Sephadex G10. Après lyophilisation, on obtient 1g de tétrasaccharide contenant typiquement 70 % de dérivé Δ Is-Is de formule II ($R_1, R_2, R_3, R_5, R_6 = SO_3Na$; $R_4 = H$ et $M = Na$). Le dérivé Δ Is-Is peut être éventuellement purifié par chromatographie SAX (strong anion exchange) ou selon un aspect préférentiel par précipitation fractionnée selon la méthode décrite dans 25 le brevet FR 2548672.

EXEMPLE 1

Dans un réacteur maintenu à 66°C, on introduit 5 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,35). Sous agitation, on ajoute en une fois 30 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,35 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 10 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de sodium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. Le pH de la solution est alors ramené entre 6 et 7 par addition de résine Amberlite IR120. Le mélange est filtré sur membrane Whatman GF/B puis concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 25°C. Le produit est repris avec 0,5 ml d'eau distillée puis lyophilisé. On obtient ainsi 29 mg d'un mélange de diastéréoisomères de l'oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 0, R₁ et R₆ représentent un radical SO₃Na et M est sodium [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronic-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino- β -D-mannopyranose, sel de trisodium) : Spectre proton dans D₂O, 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2), 3,75 (2H, m, H6 et H3), 3,88 (1H, m, H4), 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6), 4,22 (1H, t, J=5Hz, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,75 (1H, m, H5), 5,53 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, J=6 et 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4'); (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronic-(1 \rightarrow 4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino- β -D-glucopyranose, sel de trisodium) : Spectre proton dans D₂O, 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,34 (1H, dd, J=7 et 2Hz, H2), 3,72 (1H, t, J=8Hz, H6), 3,90 (1H, m, H3), 4,03 (1H, s, H4), 4,20 (1H, d, J=8Hz, H6), 4,23 (1H, t, J=5Hz, H3'), 4,58 (1H, m, H2'), 4,78 (1H, m, H5), 5,50 (1H, s, H1), 5,60 (1H, dd, J=6 et 1Hz, H1'), 6,03 (1H, d, J=5Hz, H4')].

EXEMPLE 2

Dans un réacteur maintenu à 62°C, on introduit 33,3 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,15). Sous agitation, on ajoute en une fois 200 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 1, R₁, R₂, R₃, R₅ et R₆ représentent un radical

SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,15 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 12 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de sodium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. Le pH de la solution est alors ramené entre 6 et 7 par

5 addition de résine Amberlite IR120. Le mélange est filtré sur membrane Whatman GF/B puis concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 25°C. Le produit est repris avec 3 ml d'eau distillée puis lyophilisé. On obtient ainsi 230 mg de l'oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 1, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_6 ,

10 représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronic-(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronic -(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino- β -D-mannopyranose, sel d'heptasodium): Spectre

15 proton dans D_2O , 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2), 3,25 (1H, m, H2"), 3,60 (1H, m, H3"), entre 3,70 et 4,70 (14H, massif, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4"/H5"/H6", H2'''/H3'''), 4,75 (1H, m, H5), entre 5,20 et 5,40 (2H, m, H1' et H1"), 5,45 (1H, m, H1'''), 5,56 (1H, m, H1), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H4); (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronic -(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1→4)

20 (1→4)- 1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino- β -D-glucopyranose, sel d'heptasodium) : Spectre proton dans D_2O , 400MHz, T=298K, δ en ppm: 3,25 (1H, m, H2"), 3,42 (1H, dd, J=4 et 1Hz, H2), 3,60 (1H, m, H3"), entre 3,70 et 4,70 (14H, massif, H3/H4/H6, H2'/H3'/H4'/H5', H4"/H5"/H6", H2'''/H3'''), 4,75 (1H, m, H5), entre 5,20 et 5,40 (2H, m, H1' et H1"), 5,45 (1H, m, H1'''), 5,52 (1H, m, H1), 5,94 (1H, d, J=5Hz, H4)].

25 EXEMPLE 3

Dans un réacteur maintenu à 62°C, on introduit 16,7 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,0063 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,7). Sous agitation, on ajoute en une fois 100 mg de l'oligosaccharide de formule (II) pour lequel n est égal à 2, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 et R_6 représentent un radical

SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium. Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,7 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 10 heures on arrête l'ajout d'hydroxyde de sodium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. Le pH de la solution est alors ramené entre 6 et 7 par

5 addition de résine Amberlite IR120. Le mélange est filtré sur membrane Whatman GF/B puis concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 25°C. Le produit est repris avec 3 ml d'eau distillée puis lyophilisé. On obtient ainsi 108 mg de l'oligosaccharide de formule (I) pour lequel n est égal à 2, R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_6 représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est

10 sodium, sous forme d'un mélange des diastéréoisomères. On note de A à F les sucres constitutifs des hexasaccharides, A étant le résidu 1,6-anhydro et F le résidu acide uronique insaturé. [(acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1→4)- acide 2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1→4)- 2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-

15 glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronique-(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino- β -D-mannopyranose, sel d'undécasodium) : Spectre proton dans D_2O , 600MHz, T=298K, δ en ppm: 3,15 (1H, s, H2(A)), 3,25 (2H, m, H2(C+E)), 3,60 (2H, m, H3(C+E)), entre 3,65 et 4,50 (19H, massif, H2(B+D)/H3(A+B+D+F)/H4(A+B+C+D+E)/H5(C+E)/H6(A+C+E)), 4,60 (1H, s,

20 H2(F)), 4,80 (3H, m, H5(A+B+D)), 5,18 (1H, s, H1(D)), 5,30 (1H, s, H1(B)), 5,34 (1H, d, H1(C)), 5,36 (1H, d, H1(E)), 5,46 (1H, s, H1(F)), 5,57 (1H, s, H1(A)), 5,95 (1H, d, J=5Hz, H4(F)) ; (acide 4-déoxy-2-O-sulfo- α -L-thréo-hex-4-enopyranosyluronique-(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronique -(1→4)-2-déoxy-2-sulfoamino-6-

25 O-sulfo- α -D-glucopyranosyl-(1→4)-acide 2-O-sulfo- α -L-idopyranosyluronique-(1→4)-1,6-anhydro-2-déoxy-2-sulfoamino- β -D-glucopyranose, sel d'undécasodium) : Spectre proton dans D_2O , 600MHz, T=298K, δ en ppm: 3,25 (2H, m, H2(C+E)), 3,42 (1H, m, H2(A)), 3,60 (2H, m, H3(C+E)), entre 3,65 et 4,50 (19H, massif, H2(B+D)/H3(A+B+D+F)/H4(A+B+C+D+E)/H5(C+E)/H6(A+C+E)), 4,60 (1H, s,

30 H2(F)), 4,80 (3H, m, H5(A+B+D)), 5,18 (1H, s, H1(D)), 5,31 (1H, s, H1(B)), 5,34

(1H, d, H1(C)), 5,36 (1H, d, H1(E)), 5,46 (1H, s, H1(F)), 5,52 (1H, s, H1(A)), 5,95 (1H, d, J=5Hz, H4(F))].

EXEMPLE 4

Dans un réacteur maintenu à 62°C, on introduit 4 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,0316 mol/l. Le pH de la solution est alors mesuré et pris comme valeur cible (pH = 11,8). Sous agitation, on ajoute en une fois 100,8 mg un mélange d'oligosaccharides de formule (II) pour lequel n est égal à 2 comprenant 55 % de dérivé Δ Is-Is-Is (R_1 , R_2 , R_3 , R_5 et R_6 représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium), 35 % de Δ Is-Is-IIs (R_1 , R_2 , R_3 , et R_6 représentent un radical SO_3Na , R_5 représente soit un radical SO_3Na ou un atome d'hydrogène, R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium) et 10 % de Δ Is-Is-IIIs (R_1 , R_2 , R_3 , R_5 et R_6 représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium, la fonction SO_3M du carbone C6 étant remplacée par un hydrogène). Le pH est alors régulé et maintenu à pH 11,8 par addition continue d'une solution d'hydroxyde de sodium à 0,5 mol/l. Après 11 heures, on arrête l'ajout d'hydroxyde de sodium et le mélange réactionnel est refroidi à 25°C. Le pH de la solution est alors ramené entre 6 et 7 par addition de résine Amberlite IR120. Le mélange est filtré sur membrane Whatman GF/B puis concentré à sec sous pression réduite (2,7 kPa), à une température voisine de 25°C. Le produit est repris avec 1,5 ml d'eau distillée puis lyophilisé. On obtient ainsi 110 mg d'un mélange d'oligosaccharides de formule (I) pour lequel n est égal à 2, contenant notamment le dérivé 1,6 anhydro Δ Is-Is-Is (R_1 , R_2 , R_3 , R_5 , R_6 représentent un radical SO_3Na , R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium) et le dérivé 1,6 anhydro Δ Is-Is-IIs (R_1 , R_2 , R_3 , R_6 , représentent un radical SO_3Na , R_5 représente soit un radical SO_3Na ou un atome d'hydrogène, R_4 représente un atome d'hydrogène et M est sodium). L'analyse CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) en mode paire d'ions permet de suivre la transformation en dérivés de formule (I). Dans ce cas, le dosage CLHP montre que la transformation est réalisée pour les dérivés Δ Is-Is-Is, Δ Is-Is-IIs.

Les médicaments selon l'invention comprennent en tant que principe actif au moins un oligosaccharide de formule (I) ou un mélange d'oligosaccharides de formule (I), sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les
5 médicaments selon l'invention peuvent être employés par voie intraveineuse, sous-cutanée, orale, rectale, topique ou pulmonaire (inhalation).

Les compositions stériles pour administration intraveineuse ou sous-cutanée, sont généralement des solutions aqueuses. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants,
10 dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

15 Comme compositions solides pour administration orale, peuvent être utilisés des comprimés, des pilules, des poudres (capsules de gélatine, cachets) ou des granulés. Dans ces compositions, le principe actif est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice, sous courant d'argon. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants,
20 par exemple un ou plusieurs lubrifiants tels que le stéarate de magnésium ou le talc, un agent favorisant l'absorption orale, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops et des élixirs pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes tels que l'eau,
25 l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales qui contiennent, outre le produit actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylèneglycols.

Les compositions pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes,
5 lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

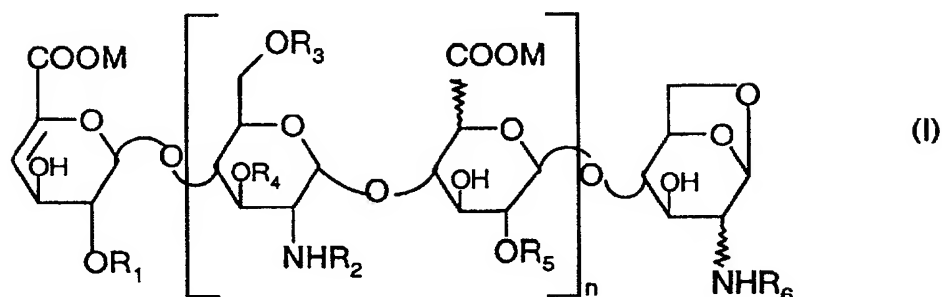
Les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée; elles sont généralement comprises entre 0,5 mg et 10 mg par kg par jour par voie sous-cutanée soit 3 à 60 mg par jour pour un adulte de 60 kg.

D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie appropriée en fonction de
10 l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

L'invention concerne également la méthode de prévention ou de traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de substances cytotoxiques telle que le nitrite oxyde (NO). Les oligosaccharides de formule (I) peuvent ainsi être utilisées pour la prévention et/ou le traitement des maladies
15 neurodégénératives pour lesquelles l'inflammation cérébrale joue un rôle délétère pouvant conduire à la mort parmi lesquelles on peut citer les ischémies cérébrales, les ischémies cardiaques (infarctus du myocarde), les ischémies périphériques, les traumatismes du système nerveux central et notamment les traumatismes crâniens, spinaux et cranio-spinaux, la sclérose en plaques, les douleurs neuropathiques et les
20 neuropathies périphériques, les maladies du motoneurone dont la sclérose latérale amyotrophique, le neuro-sida, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la Chorée de Huntington et certaines formes d'ostéoarthrites notamment à localisation articulaire.

REVENDICATIONS

1 - Oligosaccharides de formule :



dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R_1 , R_3 , R_4 et R_5 , identiques ou différents, 5
représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M , R_2 et R_6 , identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO_3M ou COCH_3 et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

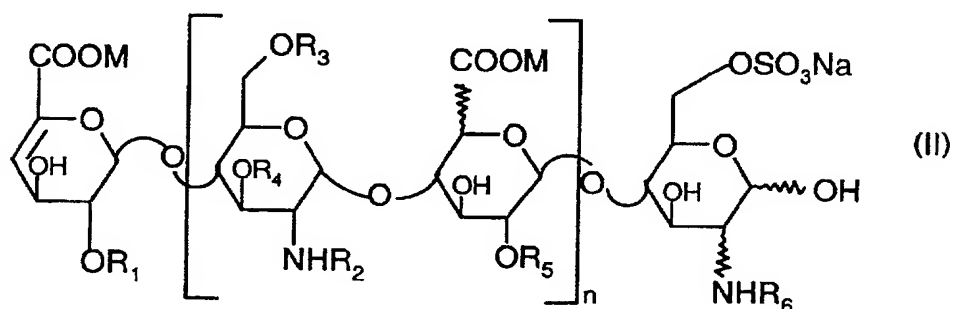
2 - Oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 1 pour lesquels R_4 10
représente un atome d'hydrogène, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

3 - Oligosaccharides de formule (I) selon l'une des revendications 1 ou 2 pour lesquels n est un entier de 0 à 10, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

15 4 - Oligosaccharides de formule (I) selon l'une des revendications 1 ou 2 pour lesquels n est un entier de 0 à 6, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

5 - Oligosaccharides de formule (I) selon l'une des revendications 1 ou 2 pour lesquels n est un entier de 1 à 6, un mélange de ces oligosaccharides et leurs diastéréoisomères.

6 - Procédé de préparation des oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on fait réagir un hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire sur des oligosaccharides de formule :



- 5 dans laquelle n est un entier de 0 à 25, R₁, R₃, R₄ et R₅, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M, R₂ et R₆, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un radical SO₃M ou COCH₃ et M est sodium, calcium, magnésium ou potassium, ou un mélange de ceux-ci et isole les oligosaccharides ou leurs mélanges.
- 10 7 - Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que l'on effectue la réaction en milieu aqueux, à une température de 40 à 80°C et à un pH de 10 à 13.
- 8 - Procédé selon l'une des revendications 6 ou 7 caractérisé en ce que l'on utilise une solution aqueuse de 1 à 5% d'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire.
- 9 - Procédé selon l'une des revendications 6 à 8 caractérisé en ce que la réaction
15 s'effectue à une température de 60 à 70°C.
- 10 - Procédé selon l'une des revendications 6 à 9 caractérisé en ce que le pH réactionnel est de 11 à 12,5.
- 11 - Procédé selon des revendications 6 à 10 caractérisé en ce que l'hydroxyde de métal alcalin ou d'ammonium quaternaire est la soude, la potasse, l'hydroxyde de
20 lithium, de césium ou l'hydroxyde de tétrabutylammonium.

- 12 - Compositions pharmaceutiques contenant en tant que principe actif au moins un oligosaccharide selon la revendication 1.
- 13 - Compositions pharmaceutiques contenant en tant que principe actif au moins un oligosaccharide selon l'une des revendications 1 à 5.
- 5 14 - Utilisation des oligosaccharides de formule (I) selon l'une des revendications 1 à 5 pour la préparation d'un médicament utile pour la prévention ou le traitement de maladies liées à un processus inflammatoire impliquant la production de nitrite oxyde (NO).
- 10 15 - Utilisation des oligosaccharides de formule (I) selon la revendication 14 pour la préparation de médicaments utiles pour la prévention et le traitement des ischémies cérébrales, cardiaques ou vasculaires périphériques, d'ostéoarthrites, des traumatismes du système nerveux central, des traumatismes crâniens, spinaux et cranio-spinaux, de la sclérose en plaques, des douleurs neuropathiques et des neuropathies périphériques, des maladies du motoneurone, de la sclérose latérale amyotrophique, du neuro-sida, de
- 15 la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson et de la Chorée de Huntington.



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2800074

N° d'enregistrement
nationalFA 577857
FR 9913182

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,A	EP 0 084 999 A (CHOAY SA) 3 août 1983 (1983-08-03) * revendication 1 * * figures 20,26,30 *	1,6, 12-14	C07H3/06 C08B37/00 A61K31/702 A61P19/00 A61P25/00
D,A	ICHIKAWA Y. ET AL.: "Synthesis, from cellobiose, of a trisaccharide closely related to the GlcNAc->GlcA->GlcN segment of the anti-thrombin-binding sequence of heparin" CARBOHYDRATE RESEARCH, vol. 141, 1985, pages 273-282, XP002142682 * page 273 * * page 275 * * page 276, composés 13 et 14 *	1,6, 12-14	
D,A	WESSEL H. P.: "Sulfated 1,6-anhydro-4-O-(beta-D-glucopyranosyluron ate)-beta-D-glucopyranosyl derivatives: syntheses and conformations" J. CARBOHYDRATE CHEMISTRY, vol. 11, no. 8, 1992, pages 1039-1052, XP000929166 * page 1039 - page 1040, alinéa 1 * * page 1042 *	1,6, 12-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C07H C08B A61K A61P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 juillet 2000		Held, P	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1

EPO FORM 1503 12/99 (P04C14)